

DISS. ETH. No. 19601

NOGO-A: GROWING ROLES OF A GROWTH INHIBITOR

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

MARIJA-MAGDALENA PETRINOVIC

Dipl. Ing. in Molecular Biology

Faculty of Science, University of Zagreb

August 25, 1974

Citizen of Croatia

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner

Prof. Dr. Ulrich Suter, co-examiner

Prof. Dr. Esther Stoeckli, co-examiner

SUMMARY

The human nervous system is a delicate and extraordinarily complex structure whose proper wiring underlies our capability to think, learn, speak, experience emotions and interact with the external world. However, the poor regenerative capacity of our brain and spinal cord renders us very vulnerable toward traumatic injuries and neurodegenerative disorders which very often lead to permanent functional impairments. Throughout the history, our central nervous system (CNS) was considered to be rather „fixed and immutable“, and consequently, spinal cord injury was seen as irreversible. Until recently, hardly any research in this area has been done and there was no progress for centuries, which in turn reinforced the impression that the problem was impossible to solve and trying to do so was considered to be a lost cause. It was during the past three decades that the attitude toward spinal cord injury has changed dramatically due to the efforts of scientists who have dared to tackle this seemingly unsolvable problem. At about the same time, the entire thinking about the CNS underwent a revolutionary transformation and what was once considered to be a fixed, rigid network of nerves, was now viewed as flexible and most possibly reparable. Those thirty years of research have yielded new biological concepts and mechanisms that can account for the failure of the CNS to successfully regenerate their axons after injury and thus brought hope to all who have been destined to hear those fate bearing words “you will never walk again”.

Chapter 1 summarizes the concept of myelin-associated inhibitors of axon outgrowth and regeneration with a special focus on their most studied member, Nogo-A. Blocking Nogo-A, either by genetic ablation or neutralization with function-blocking antibodies, enhances both compensatory and regenerative sprouting of severed sensorymotor tracts thus leading to improved functional recovery in animal models of spinal cord injury. Although the main sites of Nogo-A expression in the adult are oligodendrocytes and myelin, during development this protein is mainly expressed by neurons where its function(s) are still largely unknown. Over the last three decades of research it has become clear that, in addition to myelin-associated

growth inhibitors, other classes of molecules, such as axon guidance molecules, are likely to play a role and contribute to the poor regenerative capacity of the mammalian CNS, a concept that is also summarized in this chapter.

In *Chapter 2* we assessed the role of Nogo-A in developing neurons. Here, we demonstrate that Nogo-A is a developmental neurite growth regulatory factor with a role as a negative regulator of axon-axon adhesion and growth, and as a facilitator of neurite branching.

In *Chapter 3* we further explored the roles played by neuronally expressed Nogo-A. By genetically deleting or overexpressing Nogo-A in cerebellar Purkinje cells we provided a new insight into neuronal phenotypes of Nogo-A knockout (KO) mice. Furthermore, we provide the evidence that Nogo-A orchestrates cerebellar connectivity through regulation of synaptic transmission and elaboration of Purkinje cell dendritic morphology.

A major hypothesis for the failure of CNS axon regeneration is the presence of axon growth inhibitors that actively block regeneration. Myelin-derived axon growth inhibitors, including Nogo-A, have been vigorously studied as potential therapeutic targets. Recently, chemorepulsive axon guidance molecules have been proposed to play a role in limiting axon regeneration after spinal cord injury. In *Chapter 4* we screened intact adult spinal cords of Nogo-A KO mice for regulated known or novel growth inhibitory molecules. Our results reveal a novel growth inhibitory role for ephrinA3 in the adult CNS exerted through its receptor EphA4. Along that line, Nogo-A/EphA4 double KO mice showed increased anatomical regeneration of the corticospinal tract after spinal cord injury when compared to Nogo-A single KO mice. Thus, Nogo-A and EphA4 synergize to restrict axon growth after spinal cord trauma.

ZUSAMMENFASSUNG

Das menschliche Nervensystem ist eine extrem komplexes Gebilde, dessen korrekte Strukturierung unserer Fähigkeit des Denkens, des Lernens, des Sprechens, dem Erleben von Gefühlen und der Interaktion mit der Aussenwelt zugrunde liegt. Da sich unser Gehirn und Rückenmark allerdings durch eine sehr beschränkte regenerative Kapazität auszeichnen, können traumatische Verletzungen oder neurodegenerative Erkrankungen letztendlich einen Zustand permanenter funktioneller Beeinträchtigung bedeuten. In der früheren Vergangenheit wurde das zentrale Nervensystem als unveränderbar betrachtet, und folglicherweise die Konsequenzen einer Rückenmarksverletzung als irreversibel eingeschätzt. Bis vor kurzem wurde dieses Gebiet kaum beforscht und es gab für Jahrzehnte keinen Fortschritt darin, was wiederum den Eindruck verstärkte, dass das Problem unlösbar sei. Erst durch die Anstrengungen von Wissenschaftlern in den vergangenen drei Jahrzehnten änderte sich die Einstellung gegenüber Verletzungen des Rückenmarks und dessen Konsequenzen. Zur gleichen Zeit änderten sich auch die Ansichten über andere Teile des zentralen Nervensystems, und das, was einst als rigides Netzwerk betrachtet wurde, galt fortan als veränderbar und möglicherweise reparabel. Jene 30 Forschungsjahre führten zur Entwicklung von neuen biologischen Konzepten und der Untersuchung von Mechanismen, die für die geringe Regenerationskapazität des Zentralnervensystem verantwortlich sein könnten.

Kapitel 1 beschäftigt sich mit dem Konzept zu myelin-assoziierten Inhibitoren von axonem Wachstum und Regeneration mit starkem Fokus auf das meist-untersuchte Mitglied der Familie, nämlich Nogo-A. Die Blockade dieses Proteins, entweder durch genetische Ablation oder Neutralisierung mittels Antikörpern erhöht sowohl kompensatorisches als auch regeneratives Aussprossen von verletzten sensormotorischen Trakten und führt damit im Tiermodell zu einer funktionellen Verbesserung nach Rückenmarksverletzungen. Nogo-A wird im adulten System hauptsächlich von Oligodendrozyten und Myelin exprimiert, jedoch während der Entwicklung auch von Neuronen, wobei seine Funktion dort noch ziemlich

unerforscht ist. Während der letzten drei Jahrzehnte ist zudem klar geworden, dass zusätzlich zu myelin-assoziierten Wachstumsinhibitoren auch andere Klassen von Molekülen eine Rolle spielen und zur bescheidenen Regenerationsfähigkeit des Zentralnervensystems von Säugern beitragen.

In *Kapitel 2* wird die Rolle von Nogo-A in sich entwickelnden Neuronen behandelt. Wir zeigen, dass Nogo-A ein regulierender Faktor des Neuritenwachstums während der Entwicklung ist: es reguliert Axon-Axon-Adhäsion und Wachstum sowie Neuritenverzweigung.

Kapitel 3 zeigt weitere Rollen von neuronal exprimiertem Nogo-A auf. Durch genetische Deletion oder Überexpression von Nogo-A in cerebellaren Purkinjezellen liefern wir neue Einsichten in neuronale Phänotypen von Nogo-A-knockout-Mäusen. Weiterhin können wir aufzeigen, dass Nogo-A die Konnektivität im Kleinhirn durch Regulation synaptischer Übertragung dirigiert und die Morphologie von Purkinje-Zell-Dendritenbäumen mitbestimmt. Eine der wichtigsten Hypothesen macht das Vorhandensein von Inhibitoren des axonalen Wachstums für die mangelnde Regeneration von Axonen des Zentralnervensystems verantwortlich. Myelin-assoziierte inhibitorische Proteine, einschliesslich Nogo-A, wurden als mögliche therapeutische Angriffsziele vorgeschlagen und dahingehend untersucht. Nicht lang zurückliegende Studien schlagen chemorepulsive Axonwachstumsmoleküle als regenerationslimitierende Faktoren nach Rückenmarksverletzungen vor. *Kapitel 4* berichtet über die Ergebnisse eines Screenings von intakten Rückenmarkern von ausgewachsenen Nogo-A-knockout-Mäusen nach bekannten oder neuen Molekülen, die das Wiederauswachsen von Fasern hemmen und nach Verletzung reguliert werden. Unsere Ergebnisse deuten auf eine noch nicht identifizierte Rolle von ephrinA3 im adulten Zentralnervensystem hin, die über den EphA4-Rezeptor vermittelt wird. Damit einhergehend zeigen Nogo-A/EphA4-Doppel-knockout-Mäuse im Vergleich zu einfachen Nogo-A-knockout-Mäusen eine erhöhte anatomische Regeneration des Corticospinaltraktes nach

Rückenmarksverletzung. Nogo-A und EphA4 arbeiten also zusammen, wenn es um die Restriktion des axonen Wachstums nach Rückenmarksverletzung geht.